

***Streptomyces* sp. K22 ve K30 Suşlarından Lipaz ve Proteaz Enzim Üretimi**

Kadriye ÖZCAN^{1*}, Cengiz ÇORBACI¹

¹Giresun Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Genetik ve Biyomühendislik Bölümü, Giresun, Türkiye

*Sorumlu Yazar: kadriye.ozcan@giresun.edu.tr

Geliş Tarihi: 13.10.2017

Kabul Tarihi: 21.11.2017

Özet

Mikrobiyal enzimler önemli bir biyoteknolojik araçlardır. Birçok biyolojik ve kimyasal reaksiyonda rol almaktadırlar ve çeşitli endüstrilerdeki farklı alanlarda kendilerine önemli sayılabilecek bir yer edinmişlerdir. Mikrobiyal enzimler arasında lipaz ve proteazlar, bu grubun önemli birer üyeleridirler. Dolayısıyla, bu enzimleri üreten mikroorganizmaların seçimi ve ürettikleri enzimlerin karakteristiklerinin saptanması, pek çok araştırmacıyı bu alanda çalışmaya teşvik etmektedir. Bu çalışmada, Karadeniz deniz sediment örneklerinden izole edilmiş aktinobakteri suşlarının hücre dışı lipaz ve proteaz enzim üretim kapasitelerinin belirlenmesi ve pH ile sıcaklık kararlılıklarının saptanması amaçlanmıştır. Çalışmadan elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, bu organizmaların iyi birer lipaz ve proteaz enzim üreticisi ve bunların enzimlerinin geniş birer pH ve sıcaklık kararlılıklarına sahip oldukları saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Lipaz, proteaz, stabilite, *Streptomyces* sp.

Production of Lipase and Protease Enzymes from *Streptomyces* sp. K22 and K30 Strains

Abstract

Microbial enzymes are important biotechnological tools. They play role in several biological and chemical reactions and have acquired a significant place in different fields in various industries. Among microbial enzymes, lipases and proteases are important members of the group. Therefore, the selection of microorganisms producing these enzymes and the determination of their characteristics trigger researchers to work on this field. In this study, it was aimed to investigate production capacities of extracellular lipase and protease enzymes by actinobacteria strains isolated from Black Sea sediment samples and to determine their pH and temperature stabilities. In lights of the results obtained from the study, it was found that these organisms are well-producer of lipase and protease enzymes, and their enzymes have a wide range of pH and temperature stability.

Keywords: Lipase, protease, stability, *Streptomyces* sp.

1. Giriş

Günümüzde endüstriyel üretimde kullanılan enzimlerin pek çoğu mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Çünkü mikroorganizmalardan elde edilen enzimler bitki ve hayvanlardan elde edilenlerle karşılaştırıldığında, aktivitelerinin yüksek olması, arzu edilmeyen ara ürün oluşturmamaları, yüksek stabilite göstermeleri ve ucuz olmaları ile büyük çapta elde edilebilmeleri nedeniyle tercih edilmektedirler (Wiseman, 1987). Yine, mikroorganizmaların hızlı bir şekilde üreme ve enzim üretme yeteneği, bu grup organizmaların endüstriyel talebi karşılama ilk sırada yer almasını sağlamaktadır (Kumar ve Takagi, 1999). Ayrıca, mikrobiyal çeşitliliğin detaylı bir şekilde incelenmesi ile biyoteknolojik olarak daha kullanışlı ve etkin enzimler üretebilen organizmaların ortaya çıkarılma ihtimali de her daim araştırmacıları, enzim üretici yeni mikrobiyal suşların keşfine teşvik etmektedir (Oberoi ve ark., 2001).

Aktinobakteriler, gram pozitif bakteriler olup hemen hemen her yerde baskın olarak bulunan bir gruptur (Goodfellow ve Williams, 1983). Sekonder metabolit üretim kapasitesi yüksek olan bu organizmalar ticari olarak yoğun bir şekilde farmasötik, nötrasötik ve antitümör ajanları ile enzim ve enzim inhibitörleri gibi pek çok çeşitli biyoteknolojik ürünün üretiminde kullanılmaktadır (Remya ve Vijayakumar, 2008).

Lipaz ve proteaz enzimleri, çeşitli endüstriyel süreçte yoğun bir şekilde kullanım alanı bulan hidrolaz enzimleridirler. Lipazlar, tersinir bir şekilde hayvansal ve bitkisel yağların parçalanmasını katalizleyen enzimler olarak bilinirler ve kağıt, kozmetik, ilaç ve deterjan endüstrisi ile ziraat kimyası alanında potansiyel uygulamalara sahiptirler (Rathi ve ark., 2001). Lipazlar günümüzde, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Candida* ve *Aspergillus* gibi birçok farklı organizma türü tarafından üretilmekte ve ticari olarak piyasada yer almaktadır (Godtfredsen, 1990).

Proteazlar ise proteinlerin peptit bağlarını kırarak etki gösteren enzim grubudur (Aehle, 2007) ve deterjan, gıda, kozmetik, ilaç, deri ve tekstil sanayisinde, atıkların işlenmesinde, tıbbi teşhis ve X ışını filmleri üzerindeki jelatinin bozunması gibi pek çok çeşitli alanda kullanım bulmaktadır. En önemli endüstriyel proteaz üreticisi mikroorganizmalar *Clostridium*, *Bacillus* ve *Pseudomonas* genuslarında yer almalarına (Maal ve ark., 2009) rağmen *Bacillus* türleri ticari olarak proteaz üretmek için sıklıkla kullanılmıştır (Ferrero ve ark., 1996).

Aktinobakteri ailesine ait pek çok organizma da, özgül lipaz ve proteaz üreticileri olarak tanımlanmıştır (Sztajer ve ark., 1988; Garcia-Sanchez ve ark., 2004). Lipaz ve proteaz enzimlerinin birlikte kullanımı deterjan ve tabaklaştırma endüstrisinde olduğu gibi birçok yaygın uygulamaya sahiptir. Dolayısı ile bu enzimleri aynı anda üretebilen organizmalar oldukça önem arz etmektedir (Rangeetha ve ark., 2008). Bu nedenle belirtilen bu çalışmada, Karadeniz deniz sedimentlerinden

izole edilmiş iki *Streptomyces* suşunun hücre dışı lipaz ve proteaz enzimi üretim kapasiteleri ve stabilitelelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. Materyal ve Metot

2.1. Mikroorganizmalar

Çalışmada, Karadeniz deniz sediment örneklerinden izole edilmiş *Streptomyces* sp. K22 ve K30 suşları kullanılmıştır.

2.2. Lipaz aktivite tayini

Lipaz enzim aktivitesi, Rapp ve Backhaus (1992) tarafından önerilen metot modifiye edilerek gerçekleştirilmiştir. Özetle, 750 µl p-nitrofenol palmitat (pNPP) solüsyonu [10 ml 2-propanol içerisinde çözündürülen 30 mg p-nitrofenil palmitat, 500 µl Triton X-100 içeren 90 ml 50 mM Tris-HCl (pH 7.0) ilave edilmiştir] ile 500 µl örnek karıştırılmış ve 37°C'de 15 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında 100 µl 1 M Na₂CO₃ solüsyonu ilave edilmiş ve tekrar 37°C'de 15 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası, her bir örnekten uygun hacim alınmış ve 415 nm'de spektrofotometrede ölçüm gerçekleştirilmiştir.

2.3. Proteaz aktivite tayini

Proteaz enzim aktivitesinin analizinde, universal proteaz aktivite yöntemi modifiye edilerek kullanılmıştır. Özetle, 800 µl kazein solüsyonu [50 mM Tris-HCl tamponu (pH 7.0) içerisine %0,65 oranında kazein ilave edilmiştir] ile 320 µl örnek karıştırılmış ve 37°C'de 15 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası, karışıma 800 µl 110 mM trikloroasetik asit (TCA) solüsyonu ilave edilmiş ve karışım tekrar 37°C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra karışım, 8000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiş ve 500 µl filtrat üzerine 1,25 ml 500 mM Na₂CO₃ solüsyonu ve 250 µl dilüe Folin-Ciocalteu reaktifi ilave edilmiştir. Karışım, su banyosunda 37°C'de 30 dakika inkübasyona bırakılmış ve inkübasyon sonrası, her bir örnekten uygun hacim alınmış ve 655 nm'de spektrofotometrede ölçüm gerçekleştirilmiştir.

2.4. Total protein tayini

Enzim örneklerindeki protein miktarları, Bradford (1976) tarafından önerilen yöntem sığır serum albümini standart olarak kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

2.5. Enzim üretimi

Hücre dışı lipaz ve proteaz enzimlerinin üretimi, batık kültür fermentasyon tekniği ile gerçekleştirilmiştir. Lipaz üretimi, 250 ml Erlenmeyer içerisinde hazırlanmış 50 ml sıvı fermentasyon besiyerinde [g/L: pepton, 5; maya özütü, 5; NaCl, 0.5; CaCl₂, 0.05 ve %1 tribütirin, pH 7.0) gerçekleştirilmiştir (Kumar ve ark., 2005). Proteaz üretimi ise 250 ml Erlenmeyer içerisinde hazırlanmış 50 ml sıvı fermentasyon besiyerinde [g/L: glukoz, 10; pepton, 5; maya özütü, 5; KH₂PO₄, 1; MgSO₄.7H₂O, 0.2, pH 7.0) gerçekleştirilmiştir (Mehrotra ve ark., 1999). Dört günlük aktinomiset suşlarından alınmış uygun miktarda süspansiyon, final hacmi %5 olacak şekilde fermentasyon besiyerlerine ilave edilmiş ve erlenler 120 rpm ve 28°C'de 4 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası fermentasyon besiyerleri +4°C'de 6000 rpm'de santrifüjlenmiş ve hücrelerden arındırılmış fermentasyon ekstraları, müteakip denemelerde kullanılmıştır.

2.6. pH ve sıcaklık stabilitesi

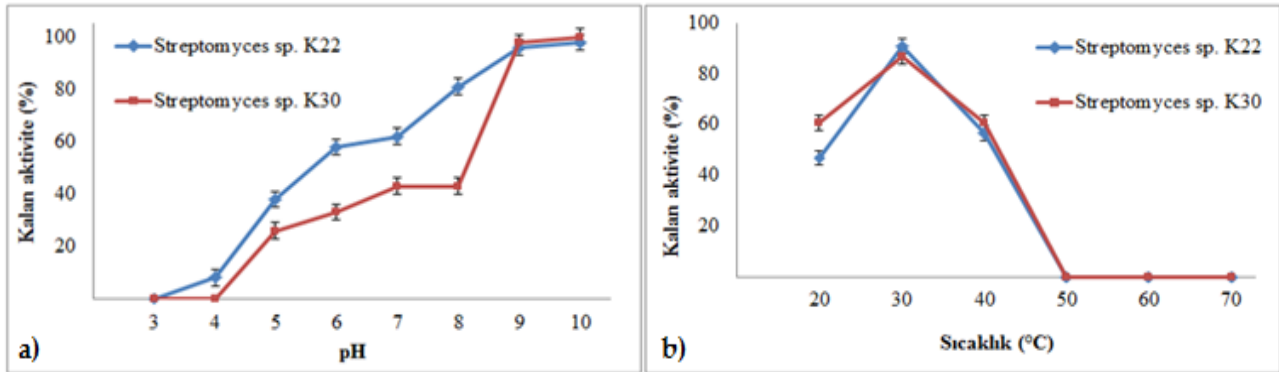
Enzimlerin pH stabilitelelerinin saptanmasında, enzim ekstraları iki hacim aseton içerisinde 6000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenerek çöktürülmüş ve elde edilen pelletler, 3 ila 10 pH derecelerine sahip tampon sistemlerinde çözündürülmüştür. Elde edilen solüsyonlar, 37°C'de 2 saat inkübe edilmiş ve enzim aktiviteleri yukarıda belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Enzimlerin sıcaklık stabilitelelerinin saptanmasında ise ekstralar farklı sıcaklık derecelerinde (20, 30, 40, 50, 60 ve 70°C) 2 saat inkübe edilmiş ve aktiviteler yukarıda belirtildiği gibi saptanmıştır.

3. Bulgular ve Tartışma

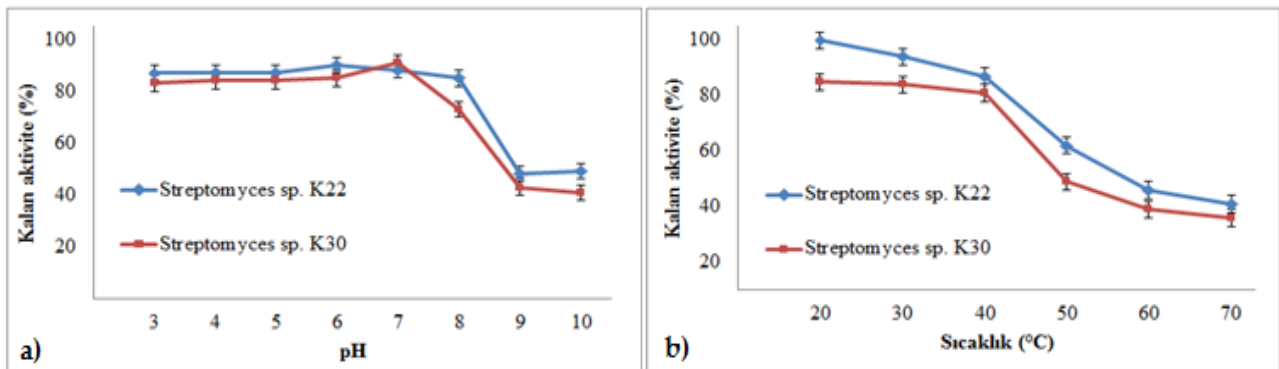
Çalışmamızda, katı besiyerlerinde lipaz ve proteaz enzimlerini ürettikleri bilinen *Streptomyces* sp. K22 ve K30 suşlarının batık kültür fermentasyon tekniği ile hücre dışı enzim üretim kapasiteleri incelenmiş ve 28°C'de 4 günlük bir inkübasyon sonrasında elde edilen fermentasyon ekstraları hücre dışı enzim üretimleri açısından değerlendirilmiştir. Bu aktinomiset suşları, lipaz enzimi açısından sırası ile 0,53 ve 0,46 U/ml; proteaz enzimi açısından ise 1,71 ve 1,92 U/ml aktivite göstermişlerdir. Bu organizmaların spesifik enzim aktiviteleri ise lipaz için sırası

ile 11,00 ve 11,29 U/mg ve proteaz için 14,45 ve 18,46 U/mg şeklinde olmuştur. Elde edilen bu veriler literatürdeki çalışmalar ile kıyaslandığı zaman bu organizmaların iyi birer lipaz ve proteaz enzim üreticileri oldukları görülmektedir. Örneğin, Mobarak-Qamsari ve arkadaşları (2011) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, *Pseudomonas aeruginosa* KM110 bakterisinden lipaz üretimi gerçekleştirilmiş ve çalışmamıza benzer şekilde yapılan aktivite çalışmaları sonucunda, substrat olarak zeytinyağı kullanarak pH 7.0'da maksimal lipaz aktivitesini 0,46 U/ml olarak bulmuşlardır.

Streptomyces sp. K22 ve K30 suşları tarafından lipaz ve proteaz enzimlerin pH ile sıcaklık stabiliteyi de ayrıca çalışmamızda incelenmiştir. Bu organizmalar tarafından üretilen lipaz enzimlerinin, proteaz enzimlerine göre nispeten daha dar bir pH ve sıcaklık skalasında stabil kalabildikleri saptanmıştır (Şekil 1 ve 2). Lipaz enzimi üreten suşlar kıyaslandığı zaman ise her iki suşun da birbirine yakın stabilite değerleri gösterdiği saptanmış ve *Streptomyces* sp. K22 suşu diğer suşa nazaran pH değişimlerinde daha kararlı iken *Streptomyces* sp. K30 suşunun sıcaklık değişimlerinde daha kararlı olduğu bulunmuştur (Şekil 1).



Şekil 1. *Streptomyces* sp. K22 ve K30 suşları lipaz enzimlerinin pH (a) ve sıcaklık (b) stabiliteyi



Şekil 2. *Streptomyces* sp. K22 ve K30 suşları proteaz enzimlerinin pH (a) ve sıcaklık (b) stabiliteyi

Proteaz enzimleri ise hem pH hem de sıcaklık açısından geniş birer stabilite skalasına sahip olmuştur (Şekil 2). Her iki organizma tarafından üretilen proteaz enzimleri, 2 saat boyunca 20 ila

70°C arasındaki sıcaklık uygulamalarına maruz kalmaları sonucunda hala belirgin aktiviteler göstermişlerdir. Yine de, 8'den sonra pH derecelerinde ve 40°C'den sonraki sıcaklık derecelerinde yaklaşık olarak %50'ye varan birer aktivite kaybı yaşamışlardır.

Stabilite sonuçları, literatür ile kıyaslanacak olursa bu organizmalar tarafından üretilen lipaz ve proteaz enzimlerinin önemli stabilite değerlerine sahip oldukları açıkça görünmektedir. Örneğin, Ghorbel ve arkadaşları (2014) tarafından hücre dışı proteazların izolasyonu ve karakterizasyonu konusunda gerçekleştirilen çalışmada araştırmacılar, *Streptomyces flavogriseus* HS1 aktinobakteri türünden elde ettikleri proteaz enzimin pH 6 ila 10 dereceleri arasında %80 civarı termal stabiliteye sahip olduklarını belirtmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar, bu enzimin bir saat boyunca 40 ve 50°C'de bekletildiğinde yaklaşık olarak sırası ile %10 ve 25 civarı aktivite kaybettiğini, 60°C'de bir saat bekletildiğinde ise aktivitenin tamamen yok olduğunu rapor etmişlerdir. Çalışmamızdan elde edilenler bu sonuçlar ile karşılaştırıldığında, çalışmada kullanılan organizmalar bu literatür ile benzer pH stabiliteleri göstermelerine karşın sıcaklık stabilitelerinde önemli farklılıklar bulunmaktadır. Şekil 2b'de de görüldüğü gibi, 2 saat 60°C'de bekletildikten sonra bile proteaz enzimleri yaklaşık %40-50 civarı aktivite göstermişlerdir. Bir diğer çalışmada Izrail-Zivkovic ve arkadaşları (2010), *P. aeruginosa* ATCC 27853 türünden proteaz enzimini izole etmişler ve kısmi saflaştırmışlardır. Gerçekleştirilen denemeler sonrasında elde edilen proteaz enzimi, sadece nötral ve bazik pH koşullarında stabil kalabilmiş asidik koşullarda ise aktivitesini neredeyse tamamen kaybetmiştir. Sıcaklık stabilitesi açısından ise enzim, 50°C'de 1.5 saat bekletildiğinde sadece %20 civarı bir aktivite kaybı yaşarken 60 ve 70°C sıcaklıklarda ise aktivitesinin yaklaşık %80 ila 90'ını kaybetmiştir. Yine, çalışmamızdan elde edilen stabilite sonuçları bu literatür ile kıyaslandığında *Streptomyces* sp. K22 ve K30 suşları tarafından üretilen proteaz enzimlerinin daha iyi stabilite gösterdikleri açıktır. Proteaz enzimlerinin yanı sıra, Ülker ve arkadaşları (2011) tarafından *Trichoderma harzianum* türünün ürettiği lipaz enziminin izolasyonu ve karakterizasyonu konulu çalışmada araştırmacılar, elde ettikleri lipaz enzimini 20 dakika boyunca 20 ila 80°C sıcaklıklara maruz bırakmışlar ve sonuçta, enzimin sadece 20 ila 40°C arasında yüksek stabilite gösterdiğini sıcaklığın artması ile enzimin tamamen aktivitesini kaybettiğini belirtmişlerdir. Çalışmamızda lipaz enzimleri, benzer stabilite sonuçları göstermişler ancak 2 saat boyunca yüksek sıcaklıklara maruz kalmışlardır. Diğer taraftan, araştırmacılar 24 saat boyunca +4°C'de farklı pH derecelerinde enzim solüsyonunu bekletmişler ve çalışmamıza benzer pH stabiliteleri elde etmişlerdir.

4. Sonuç

Enzimler hakkındaki bilgilerimizin çoğu eskilere dayanmakla birlikte, günümüzde enzimlerin üretiminde mikroorganizmaların kullanımı yakın geçmişe dayanmaktadır. Fermentasyon

ortamlarının zenginleşmesi, üretim koşullarının gelişmesi ve doğru suşların seçimi gibi pek çok sebep, enzimlerin üretiminde mikrobiyal kaynakları ön plan çıkarmıştır. Mikrobiyal enzim teknolojisinde en temel ve önemli konu, en uygun enzim ve bu enzimi üreten türün seçimidir. Bu bağlamda, mevcut çalışmada, yeni enzim üretici suşların belirlenmesi ve bu enzimlerin pH ve sıcaklık stabilitelerinin saptanması amaçlanmış olup elde edilen veriler çeşitli endüstriyel süreçlerde bu organizmaların ve/veya onların enzimlerinin kullanılabilceğini göstermektedir. Şüphesiz, bu enzimlerin saf bir şekilde elde edilmesi ve detaylı karakterizasyonunun sağlanması elzemdir.

Teşekkür

Bu çalışma, Giresun Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (Proje no: FEN-BAP-A-250414-65 ve FEN-BAP-A-140316-79) tarafından desteklenmiştir.

Kaynaklar

- Aehle, W., (2007). *Enzymes in Food Applications, Enzymes In Industry – Production and Applications*. Wiley-Verlag.
- Bradford, M., (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Ferrero, M.A., Castro, G.R., Abate, C.M., Baigori, M.D., Sineriz, F., (1996). Thermostable alkaline proteases of *Bacillus licheniformis* MIR 29: Isolation, production and characterization. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 45, 327.
- Garcia-Sanchez, A., Cerrato, R., Larrasa, J., Ambrose, N.C., Parra, A., Alonso, J.M., Hermoso-de-Mendoza, M., Rey, J.M., Mine, M.O., Carnegie, P.R., Ellis, T.M., Masters, A.M., Pemberton, A.D., Hermoso-de-Mendoza, J., (2004). Characterisation of an extracellular serine protease gene (nasp gene) from *Dermatophilus congolensis*. *FEMS Microbiology Letters*, 231: 53-57.
- Ghorbel, S., Kammoun, M., Soltana, H., Nasri, M., Hmidet, N., (2014). *Streptomyces flavogriseus* HS1: Isolation and characterization of extracellular proteases and their compatibility with laundry detergents. *BioMed Research International*, 2014, 1-8.
- Godtfredsen, S.E., (1990). *Microbial lipases*. In W.M. Fogarty and E.T. Kelly (Eds.), *Microbial Enzymes and Biotechnology* (pp. 255-274). Elsevier: Amsterdam.
- Goodfellow, M., Williams, S.T., (1983). Ecology of actinomycetes. *Annual Review of Microbiology*, 37, 189-216.
- Izrael-Zivkovic, L., Gojgic-Cvijovic, G., Karadzic, I., (2010). Isolation and partial characterization of protease from *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 75(8), 1041-1052.
- Kumar, C.G., Takagi, H., (1999). Microbial alkaline protease; from a bio industrial view point. *Biotechnology Advances*, 17, 561-594.
- Kumar, S., Kikon, K., Upadhyay, A., Kanwar, S.S., Gupta, R., (2005). Production, purification, and characterization of lipase from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus coagulans* BTS-3. *Protein Expression and Purification*, 41, 38-44.
- Maal, K.B., Emtiazi, G., Nahvi, I., (2009). Production of alkaline protease by *Bacillus cereus* and *Bacillus polymixa* in new industrial culture mediums and its immobilization. *African Journal of Microbiology Research*, 3, 491.
- Mehrotra, S., Pandey, P.K., Gaur, R., Darmwal, N.S., (1999). The production of alkaline protease by a *Bacillus* species isolate. *Bioresource Technology*, 67, 201-203.

- Mobarak-Qamsari, E., Kasra-Kermanshahi, R., Moosavi-Nejad, Z., (2011). Isolation and identification of a novel, lipase-producing bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* KM110. *Iranian Journal of Microbiology*, 3(2), 92-98.
- Oberoi, R., Beg, Q.K., Puri, S., Saxena, R.K., Gupta, R., (2001). Characterization and wash performance analysis of an SDS-stable alkaline protease from a *Bacillus* sp. *World Journal of Microbiology&Biotechnology*, 17, 493-497.
- Sangeetha, R., Geetha, A., Arulpandi, I., (2008). Optimization of protease and lipase production by *Bacillus pumilus* SG 2 isolated from an industrial effluent. *The Internet Journal of Microbiology*, 5(2), 1-8.
- Rapp, P., Backhaus, S., (1992). Formation of extracellular lipase by filamentous fungi, yeasts and bacteria. *Enzyme and Microbial Technology*, 14, 938-943.
- Rathi, P., Saxena, R.K., Gupta, R., (2001). A novel alkaline lipase from *Burkholderia cepacia* for detergent formulation. *Process Biochemistry*, 37, 187-192.
- Remya, M., Vijayakumar, R., (2008). Isolation and characterization of marine antagonistic actinomycetes from west coast of India. *Medicine and Biology*, 15(1), 13-19.
- Sztajer, H., Maliszewska, I., Wieczorek, J., (1988). Production of exogenous lipase by bacteria, fungi and actinomycetes. *Enzyme and Microbial Technology*, 10, 492-497.
- Ülker, S., Özel, A., Çolak, A., Alpay Karaoğlu, Ş., (2011). Isolation, production, and characterization of an extracellular lipase from *Trichoderma harzianum* isolated from soil. *Turkish Journal of Biology*, 35, 543-550.
- Wiseman, A., (1987). *Handbook of Enzymes Biotechnology, Second Edition*. Ellis Horwood Limited: Chichester.